

COMMUNICATION A L'ACADÉMIE VÉTÉRAIRE DE FRANCE

**Recherches sur les effets des rayons γ du Cobalt 60
sur la formation, l'utilisation et la conservation
de l'antitoxine tétanique chez le Cobaye.**

par H. BOCQUET, O. GIRARD, L. NICOL,
M. GIRARD et C. RENAUDAT.

Les effets des radiations ionisantes sur la production des anticorps ont été étudiés pour la première fois en 1906 par BENJAMIN et SLUKA (1). Ils observèrent que l'irradiation X à dose sub-léthale, administrée quelques jours avant l'injection d'une solution antigénique, abaissait la réponse anticorps, mais n'avait pas d'effet si elle était administrée après l'apparition d'anticorps circulants. Divers auteurs ont confirmé et complété ce travail, notamment CRADDOCK et LAWRENCE en 1948 (2), JACOBSON et collaborateurs en 1950 (10) TALIAFERRO en 1951 (15 et 16), KOHN en 1951 (11), DIXON et collaborateurs en 1951 et 1952 (3 et 4), HALE et STONER en 1952 et 1956 (6, 7, 8), SILVERMAN et CHIN en 1954 (13), TALIAFERRO en 1957 (17), GENGOZIAN et MAKINODAN en 1958 (5), MAKINODAN, FRIEDBERG, TOLBERT et GENGOZIAN en 1959 (12), HASEK et LENGEROVA en 1960 (9). La plupart de ces auteurs traitent des effets des rayons X, plus rarement des rayons γ , sur la production des anticorps chez les lapins, les rats et les souris, le cobaye n'ayant jamais été employé. Ils ont en outre choisi comme critères de l'immunité, la période d'induction, le taux d'augmentation journalier d'anticorps, le titre maximum d'anticorps et le titre total moyen d'anticorps d'où ils déduisent un état d'immunité relative.

En France GAUDE et COURSAGET (4) en 1955 publient une étude sur l'action des rayons γ du Cobalt 60 sur la formation des anticorps antipneumococciques chez le lapin. Ils concluent que chez cet animal, l'irradiation à des doses égales ou supérieures à 400r réduit sensiblement le taux des anticorps sériques quand l'injection d'antigène est pratiquée au moins 6 heures après l'irradiation.

Les expériences rapportées ici ont été effectuées chez le cobaye, animal qui présente certes l'inconvénient d'être très sensible à l'action des radiations ionisantes mais est un excellent producteur d'antitoxines tétaniques. Les critères de l'immunité ont été le titre d'anticorps 3 semaines après l'injection d'antigène et à cette même période une épreuve clinique à la toxine, ces critères permettant à la fois d'étudier si l'animal produit des anticorps, si ceux-ci sont utilisés et si les anticorps présents sont détruits.

Ces études présentent un vif intérêt en pathologie humaine. Ainsi MAISONNET (11) écrit que « les doses de rayonnements reçues lors d'irradiation accidentelle ou thérapeutique sont souvent suffisantes pour provoquer chez le sujet :

- une chute importante du taux d'anticorps,
- un blocage des moyens de défense de l'organisme avec aplasie médullaire transitoire ».

Dès lors, il envisage un plan de prophylaxie de l'infection chez les irradiés. En particulier, il met en garde le médecin contre l'emploi aveugle de l'antibiothérapie préventive et souligne « le rôle de la flore saprophyte normale de l'organisme qu'il faut respecter sous peine de voir se développer certains germes à la limite de la pathogénicité, ce qui n'est vraiment pas souhaitable chez un individu privé de toute défense ». Il préconise des mesures d'hygiène rigoureuses permettant de « laisser vivre l'irradié dans une atmosphère de germes saprophytes contrôlés dont la virulence peut éventuellement être atténuée par l'emploi des ultra-violets.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

1^o Dosimétrie.

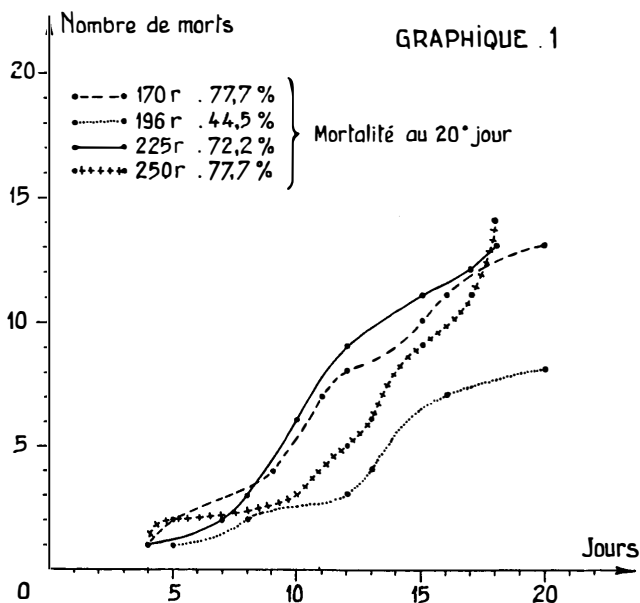
L'irradiation eut lieu à l'Institut du Cancer Gustave Roussy à Villejuif (*). Un système de trois boîtes parallélépipédiques en contre-plaqué superposées pouvant contenir chacune un cobaye fut conçu par nos soins. Ces boîtes étaient entourées sur les faces latérales en haut et en bas par d'autres boîtes en contre-plaqué remplies de riz sur une épaisseur de 5 cm et en arrière par une plaque de plexiglass de 8 cm d'épaisseur, ces derniers produits, ayant même pouvoir de diffraction que le corps, avaient pour but de réaliser une irradiation uniforme sur tout le corps de l'animal. Les trois

(*) Nous remercions M. le Professeur DENOIX, Directeur de l'Institut Gustave ROUSSY ainsi que M^{me} DUTREX et ses collaborateurs du Service de Physique, qui nous ont permis d'effectuer ces irradiations.

cobayes ainsi disposés furent placés à 90 cm d'une source de Cobalt 60 au centre du faisceau de rayons γ matérialisé préalablement par une source lumineuse. Des dosimètres constitués par de petites chambres d'ionisation furent placés successivement au niveau de la tête, du thorax et du bassin de chaque animal permettant de relever les résultats suivants : 31, 31, 31,5 r/mn, sur le côté face à la source et 22, 25, 22 r/mn en arrière de l'animal réalisant ainsi une irradiation moyenne de 28 r/mn. En outre, pour que l'irradiation soit la même sur les deux faces de l'animal, il fut nécessaire au temps T/2 de l'irradiation de tourner le dispositif de 180° en maintenant toujours la plaque de plexiglass derrière les animaux.

2° *Recherche d'une dose convenable de rayonnement pour effectuer l'expérience.*

Il s'agissait de trouver une dose permettant une survie de 1 mois des animaux irradiés et affectant cependant suffisamment l'organisme et particulièrement le système formateur d'anticorps. Nous avons employé 80 cobayes divisés en 4 lots recevant respectivement 250 r, 225 r, 196 r, 170 r.



Les résultats sont consignés sur une courbe (graphique 1) ; en abscisse sont portées les dates à partir du jour de l'irradiation qui a eu lieu le 28 octobre, et en ordonnée figure le nombre de morts.

Il apparaît qu'aux doses considérées la survie est insuffisante pour permettre de tirer des conclusions intéressantes puisque nous avons 77,7 % de morts au 21^e jour avec 250 r, 72,2 % avec 225 r, 77,7 % avec 170 r et 44,5 % avec 196 r. Aussi nous avons fixé arbitrairement à 140 r la dose de rayons γ que devaient recevoir les cobayes. Il nous fallait en effet tenir compte de la fragilité des animaux d'expérience qui étaient décimés par la pneumonie à virus sévissant dans l'animalerie où ils vivaient.

3^o *Matériel et méthode.*

L'expérience fut réalisée avec 400 cobayes adultes divisés en 4 lots afin d'étudier les effets des rayons γ sur la conservation, la formation et l'utilisation d'antitoxines tétaniques lorsque cette irradiation a lieu à des moments variés par rapport à l'injection antigène :

- animaux irradiés 3 semaines ou 36 heures après vaccination,
- et animaux irradiés 4 heures ou 12 heures avant vaccination.

La vaccination fut réalisée par l'injection intramusculaire à la cuisse de 2 ml d'anatoxine tétanique brute, à laquelle le cobaye réagit par la formation d'une importante quantité d'antitoxines faciles à doser dans son sérum au bout de 3 semaines.

Les animaux qui ont subi immunisation seule ou immunisation plus irradiation furent ensuite éprouvés de 2 façons :

a) titrage individuel du taux d'antitoxines par la méthode d'Ehrlich exprimé en unités internationales d'antitoxines par ml de sérum.

b) épreuve à la toxine qui consiste à injecter à l'animal par voie intramusculaire à la cuisse, 10 doses mortelles de toxine tétanique et à contrôler 96 heures après si celui-ci meurt en présentant un tétanos localisé caractérisé par une raideur de tout le membre

EXPÉRIMENTATION

1^o Animaux vaccinés 3 semaines avant irradiation :

100 animaux immunisés le 28 octobre et divisés en 2 lots de 50 animaux.

Lot. 88 :

Témoins vaccinés non irradiés mais inoculés 3 semaines après (le 18 novembre) avec 10 doses mortelles de toxine tétanique.

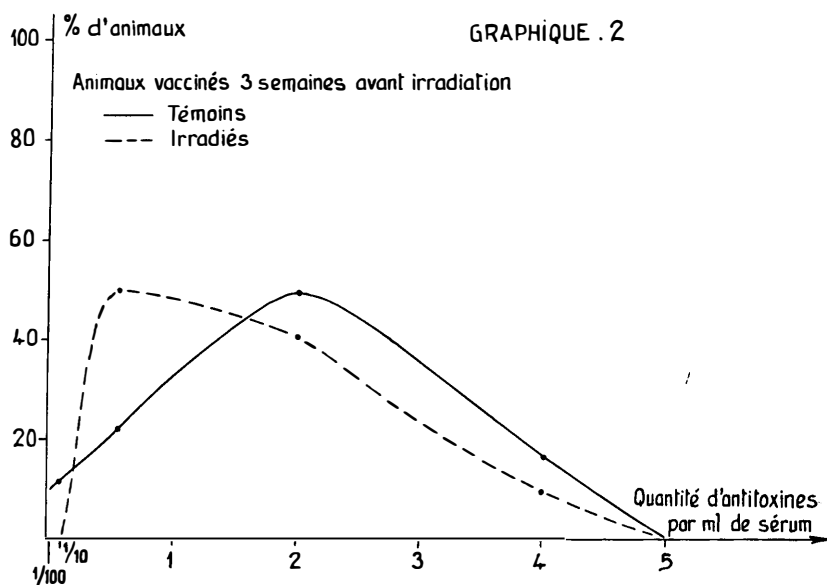
Lot. 87 :

Animaux vaccinés puis irradiés 3 semaines après (le 18 novembre) avec 140 r.

Résultats : Ils sont consignés dans le tableau 1 et sur le graphique 2.

TABLEAU n° 1

Unités d'antitoxines par ml de sérum	Témoins	Lot : 88	Irradiés	Lot : 87
1/100 à 1/10	2	11 %	0	0
1/10 — 1	4	22 %	11	50 %
1 — 3	9	49,5 %	9	40,9 %
3 — 5	3	16,5 %	2	9,9 %
Animaux soumis au ti- trage	18		22	
Tétanos*	5	27,7 %	4	19 %
Pas de tétanos	13	72,2 %	17	81 %
Animaux éprouvés ...	18		21	



* Tous ces animaux ont présenté un tétanos localisé à partir du 2^e, 3^e ou 4^e jour après l'injection de toxine mais la plupart ont survécu et quelques-uns seulement sont morts au 7^e jour.

L'analyse de ces résultats fait apparaître une légère différence dans le taux d'antitoxines qui pourrait faire croire à la destruction d'une petite quantité de celles-ci par les rayons γ . Inversement le pourcentage de tétanos est légèrement inférieur chez les animaux irradiés. En fait ces écarts sont trop faibles, par rapport au nombre total d'animaux, pour être significatifs, ce que M. GIRARD au C. R. D. D. a confirmé par le calcul statistique selon la méthode d'analyse de variance avec pour référence les tables de SNEDECOR (14).

2^o Animaux vaccinés 36 heures avant irradiation :

100 animaux furent immunisés le 24 novembre et divisés en 2 lots :

Lot. 29 :

Témoins vaccinés non irradiés mais soumis 3 semaines après, les uns au titrage des anticorps, les autres à l'épreuve à la toxine.

Lot. 28 :

Animaux vaccinés, irradiés 36 heures après avec 140 r et soumis 3 semaines après au titrage des anticorps ou à l'épreuve à la toxine.

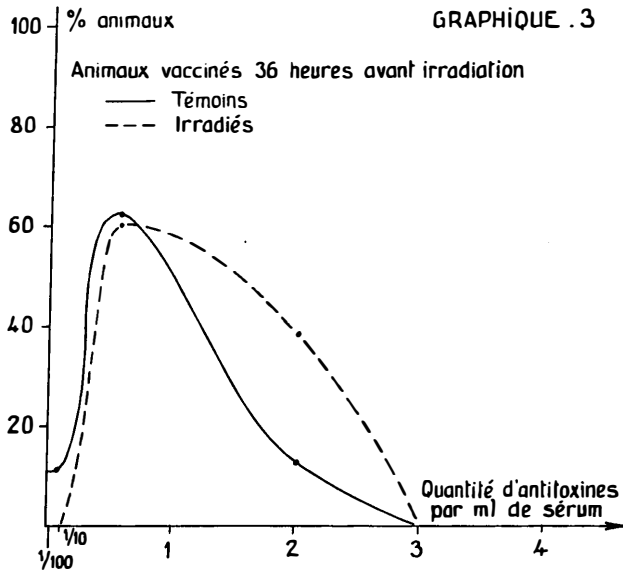
Résultats : Ils sont consignés dans le tableau 2 et dans le graphique 3.

TABLEAU n^o 2

Unités d'antitoxines par ml de sérum	Témoins	Lot 29	Irradiés	Lot 28
1/300 — 1/100	2	11,5 %	0	0
1/100 — 1/10	2	11,5 %	0	0
1/10 — 1	12	63,1 %	8	61,4 %
1 — 3	3	17,3 %	5	38,3 %
3 — 5	0	0	0	0
Animaux soumis au ti- trage	19		13	
Tétanos*	8	47 %	4	26,6 %
Pas de tétanos	9	53 %	11	73,4 %
Animaux éprouvés ...	17		15	

L'analyse de ces résultats montre que l'irradiation à la dose de 140 r de cobayes vaccinés 36 heures avant stimule légèrement la

* Le tétanos est apparu le 2^e, parfois le 3^e ou le 7^e jour, mais tous les animaux ont survécu.



production des anticorps et les anticorps formés sont très bien utilisés, ce que M. GIRARD confirme par étude statistique comme précédemment (résultat significatif à 5 % d'erreur).

3° Animaux vaccinés 4 heures après irradiation :

100 animaux furent divisés en 2 lots.

Lot. 18 :

Témoins immunisés le 18 novembre, soumis 3 semaines après les uns au titrage des anticorps sériques, les autres à l'épreuve à la toxine.

Lot. 19 :

Animaux irradiés le 18 novembre, vaccinés contre le tétanos 4 heures après et soumis au titrage des anticorps sériques ou à l'épreuve à la toxine 3 semaines plus tard.

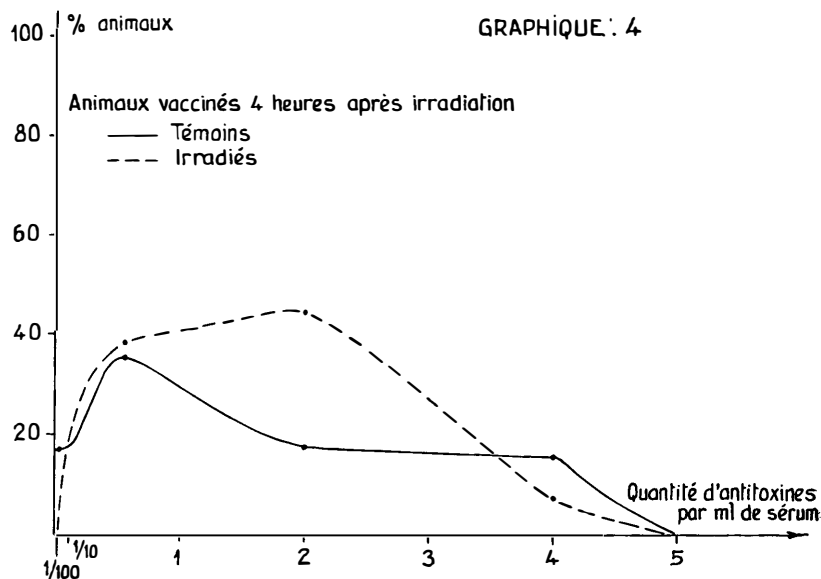
Les résultats sont consignés dans le tableau 3 et le graphique 4.

L'analyse des résultats montre que l'irradiation de cobayes 4 h avant la vaccination n'empêche pas la formation des anticorps à la dose de 140 r et les anticorps formés sont utilisés efficacement.

Il semble même qu'à cette période, l'irradiation stimule la pro-

TABLEAU n° 3

Unités d'antitoxines par ml de sérum	Témoins	Lot 18	Irradiés	Lot 19
+ 1/300 — 1/100	3	17,6 %	0	0
+ 1/100 — 1/10	3	17,6 %	1	7,6 %
+ 1/10 — 1	6	35,2 %	5	38 %
+ 1 — 3	3	17,6 %	6	45 %
+ 3 — 5	2	15,9 %	1	7,6 %
Animaux soumis au ti- trage	17		13	
Tétanos*	8	47 %	5	38,4 %
Pas de tétanos	9	53 %	8	61,6 %
Animaux éprouvés ...	17		13	



duction des anticorps, mais contrairement à l'expérience précédente, les écarts avec les témoins sont trop faibles pour être significatifs, ce que M. GIRARD vérifie par la méthode statistique.

4° Animaux vaccinés 12 heures après l'irradiation :

100 animaux furent divisés en 2 lots :

* Le tétanos est apparu le 2^e, 3^e ou 4^e jour, mais tous les animaux ont survécu.

Lot. 36 :

Témoins vaccinés le 26 novembre non irradiés mais soumis 3 semaines après aux épreuves habituelles.

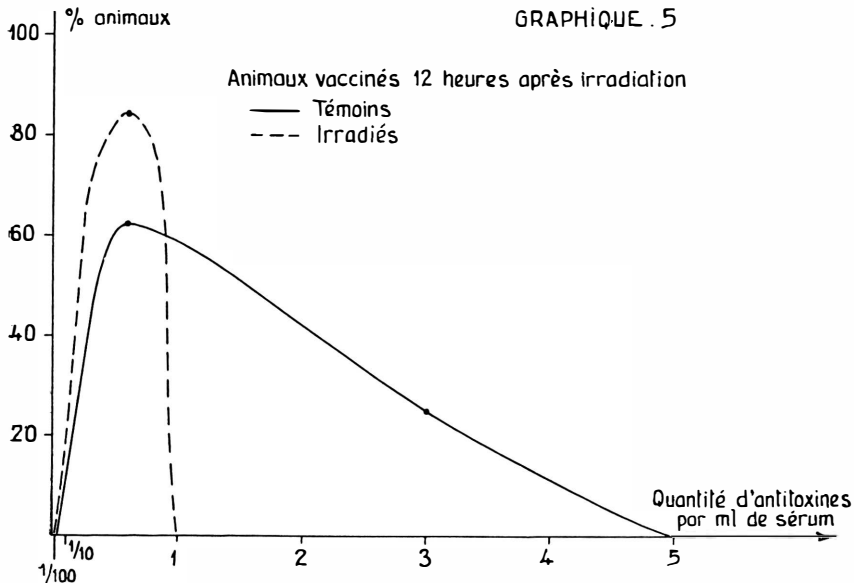
Lot. 35 :

Irradiés le 25 novembre en fin d'après-midi et vaccinés le 26 en début de matinée soit 12 à 15 heures plus tard et soumis 3 semaines après aux épreuves habituelles.

Les résultats sont consignés dans le tableau 4 et le graphique 5.

TABLEAU n° 4

Titrage	Témoins	Lot 36	Irradiés	Lot 35
+ 1/100 — 1/10	2	12,5 %	3	15,7 %
+ 1/10 — 1	10	62,5 %	16	84,3 %
+ 1 — 5	4	25 %	0	0
Animaux soumis au titrage	16		19	
Tétanos*	5	33,3 %	15	79 %
Pas de tétanos	10	66,7 %	4	21 %
Animaux éprouvés ...	15		19	



* Le tétanos est apparu le 2^e, 3^e ou 7^e jour et quelques-uns seulement sont morts à partir du 7^e jour.

L'analyse des résultats révèle des titres d'antitoxines inférieurs aux témoins, qui pourraient faire croire à une inhibition dans la formation des anticorps mais il faut remarquer que les animaux irradiés présentent un taux encore relativement élevé d'anticorps situé entre 1/100 et 1 unité, en moyenne 1/2 U par ml de sérum, ce qui empêche de conclure à un effet inhibiteur, ce que M. GIRARD au C. R. D. D. vérifie par étude statistique (Résultat non significatif) ; une nouvelle expérimentation serait à envisager. En outre le pourcentage des tétanos est bien élevé chez les irradiés ce qui permet de conclure à une inhibition dans l'utilisation des anticorps sous l'effet de l'irradiation (résultat significatif à 1 % d'erreur).

CONCLUSION

Les expériences relatées précédemment nous permettent de conclure :

1° La conservation des anticorps (antitoxines tétaniques) chez les cobayes n'est pas modifiée par une irradiation totale de 140 r 3 semaines après l'immunisation, le faible écart observé n'étant absolument pas significatif.

2° Les anticorps formés sont utilisés aussi efficacement chez les cobayes irradiés à 140 r, 36 heures après ou 4 heures avant la vaccination par rapport aux témoins ; mais lorsque l'irradiation a lieu 12 à 15 heures après vaccination, les anticorps ne sont pas utilisés efficacement comme le révèlent les nombreux cas de tétanos observés.

3° Les rayons γ à la dose de 140 r, chez le cobaye, stimulent légèrement la production des anticorps lorsqu'ils sont administrés 36 heures après vaccination ; le même effet de stimulation se retrouve peut-être lorsque l'irradiation a lieu 4 heures avant la vaccination mais on entrevoit un effet inhibiteur lorsque l'irradiation a lieu 12 à 15 heures après la vaccination ; il conviendrait de mettre plus en évidence ces deux derniers résultats par de nouvelles expériences.

*(Laboratoire de Radiodétection et de Radiodécontamination
du Service Biologique et Vétérinaire de la 1^{re} Région Militaire,
Ecole Militaire, Paris (7^e),
en collaboration avec l'Institut Pasteur de Garches (Seine-et-Oise).*

BIBLIOGRAPHIE.

1. BENJAMIN (E.) and SLUKA (E.). — Antikörperbildung nach experimentelles Schädigung des hämatopoetischen Systeme durch Röntgenstrahlen, *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1908, 21, 311-313.

2. CRADDOCK (C. G.) and LAWRENCE (J. S.). — The effects of roentgen irradiation on antibody formation in rabbits. *S. Immunol.* 1948, 60, 241-254.
 3. DIXON (F. J.), TALMAGE (D. W.) and BUKANTZ (S. C.). — Radiosensitive and radioresistant phases in antibody production. *Fédération. Proc.*, 1951, 10, 407.
 4. GAUDE (G.) et COURSAGET (J.). — Influence de l'irradiation par les rayons γ sur divers facteurs d'immunité. Rapport CEA, 1955, n° 428.
 4. DIXON (F. J.), TALMAGE (D. W.) and MAURER (P. H.). — Radiosensitive and radioresistant phases in the antibody response. *J. Immunol.*, 1952, 68, 693-700.
 5. GENGOZIAN (N.) and MAKINODAN (T.). — Relation of primary antigen injection to time of irradiation on antibody production in mice. *J. Immunol.*, 1958, 80, 189-197.
 6. HALE (W. M.) and STONER (R. D.). — The effect of cobalt 60 gamma radiation on antibody formation and immunity. *Intern. Record Med. and. gen. Pract. Clins.*, 1952, 165, 358-360.
 7. HALE (W. M.) and STONER (R. D.). — Effects of ionizing radiation on immunity. *Radiation Research*, 1954, 1, 459-469.
 8. HALE (W. M.) and STONER (R. D.). — The effect of Cobalt 60 gamma radiation on tetanos antitoxin formation in mice. *J. Immunol.*, 1956, 77, 410.
 9. HASEK et LANGEROVA. — Mechanism in radiobiologie, édité par Errera et Forssberg, *New-York Academic Press*, 1960.
 10. JACOBSON (L. O.), ROBSON (M. E.) and MARKS (E. K.). — The effect of X irradiation on antibody formation. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1950.
 11. KOHN (H. I.). — Effect of X rays upon homolysin production in the rat. *J. Immunol.*, 1951, 66, 525.
 11. MAISONNET (M.). — Prophylaxie de l'infection chez les irradiés. *La Vie Médicale*, juin 1960, 41, 5.
 12. MAKINODAN (T.), FIEDBERG (B. M.), TOLBERG (M. C.) and GENGOZIAN (N.). — Relation of secondary antigen injection to time of irradiation on antibody production in mice. *J. Immunol.*, 1959, 83, 184.
 13. SILVERMAN (M. S.) and CHIN (P. M.). — Quantitative serological determination of antibody formation in X irradiated rabbits. *J. Immunol.*, 1954, 73, 120-124.
 14. SNEDECOR (L. W.) and COCHRAN (W. L.). — Statistical methods. *The Iowa State University Press*, 1956.
 15. TALIAFERRO (W. H.) and TALIAFERRO (L. G.). — Effet of X rays on immunity : a review. *J. Immunol.*, 1951, 66, 181.
 16. TALIAFERRO (W. H.), TALIAFERRO (L. G.) and JANSSEN (E. F.). — The localisation of X ray to the initial phases of antibody response, *J. Infectious Diseases*, 1952, 91, 105, 124.
 17. TALIAFERRO (W. H.). — Modification of the immune response by radiation and cortisone. *Ann. New-York Acad. Sciences*, 1957, 69, 745-763.
-